

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Жураковская О.Я., 2014

УДК 611.83:616-001.28/29

**ВОЗРАСТНАЯ МОРФОЛОГИЯ СРЕДИННОГО ВОЗВЫШЕНИЯ
НЕЙРОГИПОФИЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
САХАРНОМ ДИАБЕТЕ (УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

О.Я. ЖУРАКОВСКАЯ

ГБУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет»,
г. Ивано-Франковск

**AGE MORPHOLOGY OF THE MEDIAN EMINENCE
OF NEUROHYPOPHYSIS IN EXPERIMENTAL DIABETES
MELLITUS (ULTRASTRUCTURAL STUDIES)**

O.YA. ZHURAKOVSKAYA

Shei «Ivano-Frankivsk national medical University», Ivano-Frankovsk

На 7-е сутки после моделирования стрептозотоцинового диабета в нервных волокнах наружного слоя срединного возвышения нейрогипофиза 3-месячных животных возрастает объемная доля нейросекреторных гранул ($p < 0,05$), а в портальных гемокапиллярах наблюдается увеличение численности фенестр, расширение перикапиллярных пространств, тогда как морфоструктура срединного возвышения нейрогипофиза 24-месячных животных остается интактной. На 28-е сутки эксперимента функциональная активность нейросекреторных клеток переднего и среднего гипоталамуса исследуемых животных повышается, о чем свидетельствует рост объемной части НГ в наружном ($p < 0,01$) и внутреннем ($p < 0,01$) слоях срединного возвышения. В портальных гемокапиллярах отмечаются признаки развития диабетической микроангиопатии.

Ключевые слова: стрептозотоциновый диабет, нейрогипофиз.

The volume fraction of neurosecretory granules in the nerve fibers of the outer layer of the median eminence of neurohypophysis was increased ($p < 0.05$) in 3-month-old animals on day 7 of streptozotocin-induced diabetes. The amplification of fenestrae in portal blood capillaries and extension of pericapillary spaces were observed while the morphology of the median eminence of neurohypophysis in 24-month old animals remained intact. The functional activity of neurosecretory cells of the anterior and medial hypothalamus in tested animals enhanced on experimental day 28 as was evidenced by increased volume fraction of neurosecretory granules in external ($p < 0.01$) and internal ($p < 0.01$) layers of the median eminence. Development of diabetic microangiopathy was revealed in portal blood capillaries.

Keywords: streptozotocin-induced diabetes, neurohypophysis.

Введение

Одной из наиболее актуальных проблем клинической медицины является сахарный диабет, что обусловлено массовостью заболевания, клиническим полиморфизмом и тяжестью осложнений [2, 3]. Ежегодный прирост показателя заболеваемости сахарным диабетом составляет примерно 15% [3]. С учетом сказанного выше актуальны исследования о морфофункциональных изменениях срединного возвышения нейрогипофиза при сахарном диабете, которые позволят раскрыть основные структурные механизмы нарушений нейрогуморальной регуляции эндокринных функций организма и панкреатических островков при данном заболевании, поскольку именно передний и средней гипоталамус обеспечивает стимуляцию В- и А-клеток панкреатических островков поджелудочной железы и выделение ими инсулина и глюкагона [6].

Согласно современным представлениям, срединное возвышение

нейрогипофиза – это проксимальная часть нейрогипофиза. Как известно по данным международной анатомической номенклатуры, составными частями нейрогипофиза являются проксимально-срединное возвышение, гипофизарная ножка и дистально-нервная часть нейрогипофиза. Срединное возвышение состоит из внутренней зоны, в которой превалируют аксоны гипоталамо-нейрогипофизарной системы, в частности, надзрительного и паравентрикулярного ядер. Наружная зона срединного возвышения состоит из аксонов мелкоклеточных ядер гипоталамуса глии и капилляров первичной портальной системы гипофиза. При ультраструктурном анализе нейросекреторные гранулы аксонов внутренней зоны срединного возвышения имеют больший диаметр ($169,86 \pm 14,49$ нм) в отличие от аксонов мелкоклеточных ядер гипоталамуса, которые входят в состав гипоталамо-аденогипофизарной системы и имеют меньший диаметр ($78,42 \pm 3,24$ нм).

Цель исследования

Установить основные закономерности структурной перестройки срединного возвышения нейрогипофиза при экспериментальном сахарном диабете у 3- и 24-месячных крыс.

Материалы и методы

Материалом исследования был гипоталамо-гипофизарный комплекс 20 крыс-самцов линии Вистар в возрасте 3 и 24 месяцев, распределенных на 2 группы - контрольную (10 животных) и экспериментальную (10 животных). У животных экспериментальной группы моделировали сахарный диабет путем внутрибрюшинного введения стрептозотоцина [5], контрольным животным в эквивалентном объеме вводили 0,1 М цитратный буфер с рН 4.5. Крыс выводили из эксперимента на 7-е и 28-е сутки под тиопенталовым наркозом путем декапитации и забирали материал для исследования.

Для гистологического исследования кусочки материала фиксировали в растворе Буэна, изготавливали парафиновые блоки, срезы красили альдегид-фуксином по Гомори. Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 2% растворе четырехоксида осмия, проводили и контрастировали общепринятым методом. Изучение материала проводили на электронном микроскопе ПЭМ-125 К при ускоряющем напряжении 75 кВ с последующим

фотографированием при увеличении от 12000 до 20000 раз. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали 1% раствором метиленового синего. Гистологические препараты и полутонкие срезы изучали под световым микроскопом МС 300 (ТХР) и фотографировали с помощью цифровой камеры DCM 900.

Морфометрию препаратов осуществляли с использованием программного обеспечения NIH USA «Image J» в автоматическом или ручном режиме с учетом увеличений. Нейросекреторный процесс оценивали по показателям объемной плотности нейросекреторных гранул в аксонах гипоталамо-нейрогипофизарного и туберо-гипофизарного путей ($V_i = (P_i / P_t) \times 100$ [1]).

Биохимические показатели инсулина, гликированного гемоглобина определяли в сыворотке крови в сертифицированной лаборатории «Диамеб». Уровень глюкозы определяли в капле крови из хвостовой вены на глюкометре фирмы «Accu Chek» (Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Stat. Soft. Inc; Tulsa, OK, USA; Statistica 6 и непараметрических методов анализа (критерий Уилкоксона-Манна-Уитни).

Результаты и их обсуждение

На 7-е сутки после начала моделирования стрептозотоцинового сахарного диабета уровень глюкозы в крови

увеличивается у 3-месячных животных до $12,22 \pm 0,34$ ммоль/л (контроль $3,69 \pm 0,12$ ммоль/л, $p < 0,001$), у 24-месячных до $8,66 \pm 0,17$ ммоль/л (контроль $5,69 \pm 0,15$ ммоль/л, $p < 0,05$) на фоне снижения инсулина у 3-месячных крыс до $1,87 \pm 0,09$ Ед/мл (контроль $3,52 \pm 0,03$ Ед/мл, $p < 0,01$), у 24-месячных крыс до $1,95 \pm 0,09$ Ед/мл (контроль $4,24 \pm 0,15$ Ед/мл, $p < 0,01$). Гипергликемия приводит к увеличению гликированного гемоглобина у 3-месячных животных к $2,16 \pm 0,04\%$ (контроль $1,79 \pm 0,31\%$, $p > 0,05$), у 24-месячных животных к $4,04 \pm 0,14\%$ (контроль $2,21 \pm 0,06\%$, $p < 0,01$). Следует обратить внимание на то, что такие уровни гликированного гемоглобина находятся в границах допустимой нормы.

В этот период эксперимента структура внутренней зоны срединного возвышения нейрогипофиза 3- и 24-месячных крыс не отличается от таковой в контрольной группе животных. Диаметр нейросекреторных гранул (НГ) гипоталамо-гипофизарного тракта и их объемная плотность не изменяются по сравнению с показателями в контрольной группе, в то время как в наружной зоне срединного возвышения нейрогипофиза 3-месячных животных наблюдается рост объемной плотности НГ (табл. 1). В портальных гемокапиллярах 3-месячных животных отмечается увеличение численности и протяженности фенестр, расширение перикапиллярных пространств.

Таблица 1

Показатели объемной плотности и диаметр НГ срединного возвышения нейрогипофиза при экспериментальном сахарном диабете ($M \pm m$, $n=5$)

	Внутренняя зона				Наружная зона			
	диаметр НГ, нм		объемная плотность НГ, %		диаметр НГ, нм		объемная плотность НГ, %	
	конт-роль	экспе-римент	конт-роль	экспе-римент	конт-роль	экспе-римент	конт-роль	экспе-римент
7-е сутки								
3-месяч-ные крысы	$148,65 \pm 1,26$	$146,89 \pm 1,34$	$6,68 \pm 0,08$	$6,71 \pm 0,09$	$76,34 \pm 0,29$	$81,64 \pm 1,08$	$6,54 \pm 0,24$	$12,26 \pm 0,87^*$
24-месяч-ные крысы	$147,54 \pm 1,25$	$143,24 \pm 1,53$	$6,04 \pm 0,09$	$6,12 \pm 0,03$	$79,63 \pm 0,24$	$79,87 \pm 1,03$	$4,21 \pm 0,29$	$4,23 \pm 0,32$
28-е сутки								
3-месяч-ные крысы	$151,37 \pm 3,27$	$174,26 \pm 6,35^*$	$6,54 \pm 0,17$	$19,56 \pm 0,64^{* \#}$	$69,25 \pm 0,58$	$71,26 \pm 0,96$	$6,51 \pm 0,36$	$10,15 \pm 0,72^{* \#}$
24-месяч-ные крысы	$153,85 \pm 3,67$	$169,36 \pm 8,39^{* \#}$	$6,17 \pm 0,21$	$11,13 \pm 0,46^{* \#}$	$72,36 \pm 0,86$	$70,65 \pm 0,87$	$4,08 \pm 0,12$	$6,58 \pm 0,13^{\#}$

* - разница между показателями контроля и эксперимента животных одной возрастной группы, $p < 0,05$;

- разница показателей у животных одной возрастной группы по сравнению с показателями предыдущего периода наблюдения, $p < 0,05$.

На 28-е сутки эксперимента по сравнению с 7-ми сутками уровень глюкозы и гликированного гемоглобина в крови продолжает увеличиваться, у 3-месячных животных, соответственно, до $15,78 \pm 0,22$ ммоль/л ($p < 0,05$) и $7,64 \pm 0,13\%$ ($p < 0,01$), у 24-месячных до $14,79 \pm 0,24$ ммоль/л ($p < 0,001$) и $8,15 \pm 0,18\%$ ($p < 0,001$) на фоне снижения уровня инсулина у 3-месячных крыс к $1,31 \pm 0,06$ Ед/мл ($p < 0,05$), у 24-месячных - $1,21 \pm 0,06$ Ед/мл ($p < 0,05$).

В разных зонах срединного возвышения наблюдается увеличение нейросекрета по ходу нервных волокон. В наружной зоне срединного возвышения встречаются аксоны, переполненные НГ (рис. 1Б). Объемная плотность мелких и крупных НГ уменьшается по сравнению с предыдущим периодом эксперимента при неизменном их диаметре (табл. 1). Обращает на себя внимание значительный полиморфизм строения НГ в аксонах гипоталамо-нейрогипофизарного тракта внутренней зоны срединного возвышения (рис. 1А). Одни из них (молодые) имеют матрикс высокой электронно-оптической плотности и мембрану, зрелые НГ характеризуются матриксом умеренной электронно-оптической плотности, диффундирующие НГ содержат небольшую сердцевину умеренной электронно-оптической плотности и широкий светлый подмембранный ободок.

В портовых гемокапиллярах наружной зоны наблюдаются эритро-

цитарные сладжи, тромбоцитарные, лейкоцитарные и смешанные клеточные агрегаты. Ядра эндотелиоцитов с маргинально конденсированным хроматином, увеличены в объеме и резко выступают в просвет капилляра (рис. 1В). Кариолемма образует глубокие инвагинации. Около ядра расположены расширенные единичные цистерны гранулярной эндоплазматической сети, на поверхности которых отмечается небольшое количество рибосом. В митохондриях наблюдаются просветление матрикса и деструкция крист. Цитоплазма эндотелиоцитов 24-месячных животных вакуолизирована, а 3-месячных уплотнена. У последних люминальная плазмолемма образует микровыросты в просвет капилляра, что приводит к клазматозу и ухудшению кровотока (рис. 1В). Контакты между эндотелиоцитами расширены, а иногда расходятся, и между клетками образуются межэндотелиальные каналы. Базальная мембрана неравномерно расширена и утолщена. Перикапиллярные пространства резко расширены (рис. 1В). Уменьшается количество контактов аксонов нейросекреторных клеток и капилляров. У 24-месячных животных в наружной зоне срединного возвышения встречаются аксоны, которые имеют светлую аксоплазму и содержат вакуоли, деструктивно измененные митохондрии, одиночные нейрофибриллы.

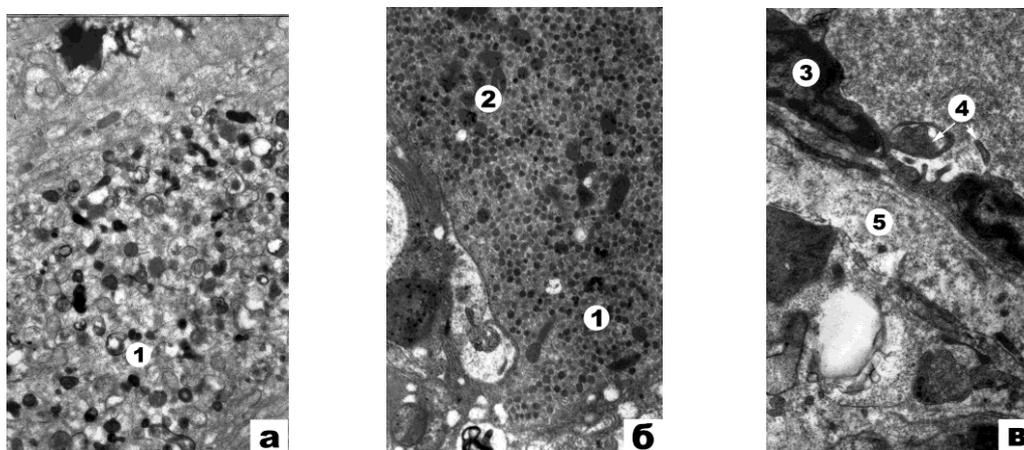


Рис. 1. Ультраструктурные изменения срединного возвышения нейрогипофиза 24- (А) и 3-месячных (Б, В) животных на 28-е сутки экспериментального сахарного диабета. А - х 12 000, Б - х 8000, В - х 8000.

1 - НГ, 2 - митохондрии, 3 - ядро эндотелиоцита, 4 - микроклазматоз, 5 - перикапиллярное пространство

В глиальных клетках отмечают маргинальное размещение ядерного хроматина, расширение перинуклеарного пространства, деструкция крист митохондрий, расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети, увеличение в цитоплазме количества лизосом с неомогенным содержанием липидных капель.

Результаты и их обсуждение

Накопление нейросекреторных гранул в аксонах срединного возвышения крупно- и мелкоклеточных нейронов гипоталамуса на 7-е сутки экспериментального сахарного диабета свидетельствует о повышении функциональной активности нейро-

секреторных клеток гипоталамуса [4]. Другими исследователями было доказано повышение в крови соматолиберина и кортиколиберина на ранних стадиях развития стрептозотоцинового диабета, что приводило к увеличению в крови соматотропного гормона и глюкокортикоидов, и как следствие к усугублению течения заболевания [7, 8]. По данным наших исследований, перестройка микроциркуляторного русла, а именно увеличение количества пор и фенестр в эндотелиоцитах, способствует более быстрому поступлению в кровь нейрогормонов.

Морфологические изменения в стенке капилляров первичной потальной сети нейрогипофиза на 28-е сутки

заболевания свидетельствуют о начальных стадиях развития диабетической микроангиопатии, которые обусловлены гормонально-метаболическими нарушениями [2]. Гипергликемия и повышение уровня гликозилированного гемоглобина, согласно нашим наблюдениям, приводят к возникновению эритроцитарных сладжей и деструкции эндотелиоцитов, а также, по мнению других авторов, нарушениям оксигенации с гиперпродукцией контринсулярных гормонов [7, 8]. Гипергликемия способствует усилению синтеза гликопротеинов в базальной мембране за счет повышения активности глюкозилтрансферазы [2], что, по данным наших исследований, приводит к ее утолщению на 28-е сутки экспериментального сахарного диабета.

Выводы

На 7-е сутки развития экспериментального сахарного диабета наблюдается повышение удельной плотности нейросекреторных гранул в аксонах мелко- и крупноклеточных нейронов во внутренней и наружной зоне гипоталамуса. Этот процесс более выражен у неполовозрелых животных и сопровождается перестройкой капилляров (увеличение количества фенестр, пор, образование межэндотелиальных каналов) для быстрого выделения нейrogормонов в кровь. При увеличении срока развития сахарного диабета наблюдают признаки микроангиопатии.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. 384 с.
2. Боровкова О.С. Питання патогенезу діабетичних ангиопатій / О.С. Боровкова, А.Г. Іфтодій // Буковинський медичний вісник. – 2006. – Т. 10. – № 2. – С. 132-135.
3. Деякі чинники ризику смертності на цукровий діабет першого типу в Україні, оцінені за даними загальнонаціонального реєстру / М.Д. Халангот, М.Д. Тронько, В.І. Кравченко і ін. // Ендокринологія. – 2010. – № 1. – С. 62-70.
4. Жураківська О.Я. Вікові особливості морфологічних змін гіпоталамо-нейрогіпофізарної системи на ранніх стадіях розвитку експериментального цукрового діабету / О.Я. Жураківська // Вісник проблем біології та медицини. – 2012. – № 3. – С. 164-170.
5. Патент № 62966. Україна, МПК 51 А 61 В 10/00. Спосіб моделювання цукрового діабету 1-го типу у тварин різного віку / В.А. Левицький [и др.]. Заявка № u 201101566, заявл. 11.02.2011, опубліковано 20.09.2011. // Бюлл. – № 18. – 6 с.
6. Центральные механизмы регуляции эндокринной функции поджелудочной железы / Ю.М. Колесник [и др.] // Материалы 2-го Российского

конгресса по патофизиологии. – М., 9-12 октября 2000 г. – С. 164-165.

7. Adrenal hypersensitivity precedes chronic hypercorticism in streptozotocin-induced diabetes mice / Y. Revsin [et al.] // *Endocrinology*. – 2008. – №7. – P. 3531-9.

8. Effects of a high-glucose environment on the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor: type 1 diabetes compared with in vitro glucotoxicity / K. Bédard [et al.] // *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2008. – №4. – P. 740-51.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Жураковская О.Я. – канд. мед. наук., доцент кафедры анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии Ивано-Франковского национального медицинского университета, г. Ивано-Франковск, Украина.

E-mail:perpetaoia@mail.ru.